

УДК 54.05

Study of Structure of Product's Obtained by Sulfation of Arabinogalactan from Larch Wood with Chlorosulfonic Acid in Pyridine

Natalia Yu. Vasilyeva^{a,b}, Alexander V. Levdansky^a,
Anton A. Karacharov^a, Elena V. Mazurova^a,
Galina N. Bondarenko^a, Vladimir A. Levdansky^{a,b},
Alexander S. Kazachenko^{a,b} and Boris N. Kuznetsov^{a,b,*}

^a*Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
50-24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia*

^b*Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia*

Received 24.10.2014, received in revised form 26.11.2014, accepted 02.12.2014

The structure of the arabinogalactan (AG) and its sulfates was characterized by method of FT Raman spectroscopy. It was established, that after sulfation of AG with a chlorosulfonic acid in pyridine, there was an introduction of sulfate groups in arabinogalactan chain. As shown by X-ray diffraction (XRD), initial samples of MCC had amorphous structure, and in the course of sulfation there was a further amorphization of the structure of a material. By use of scanning electron microscopy (SEM) and atomic-force microscopy (AFM) was shown, that sulfated arabinogalactan synthesized in pyridine, have different morphologies from starting arabinogalactan.

Keywords: arabinogalactan, sulfation, sulfated arabinogalactan, chlorosulfonic acid, pyridine, FT Raman spectroscopy, X-ray diffraction, scanning electron microscopy, atomic-force microscopy.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: inm@icct.ru

Изучение строения продуктов сульфатирования арабиногалактана из древесины лиственницы хлорсульфоновой кислотой в пиридине

**Н.Ю. Васильева^{а,б}, А.В. Левданский^а, А.А. Карачаров^а,
Е.В. Мазурова^а, Г.Н. Бондаренко^а, В.А. Левданский^{а,б},
А.С. Казаченко^{а,б}, Б.Н. Кузнецов^{а,б}**

*^аИнститут химии и химической технологии СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50-24*

*^бСибирский федеральный университет,
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79*

Изучено строение натриевых солей сульфатированного арабиногалактана (АГ) древесины лиственницы, полученных сульфатированием АГ хлорсульфоновой кислотой в среде пиридина. Введение сульфатных групп в структуру АГ подтверждено появлением в КР-спектрах новых полос поглощения по сравнению со спектрами исходного полисахарида. Методом рентгеновской дифрактометрии показано, что исходные образцы арабиногалактана имеют аморфное строение; в процессе сульфатирования происходит дальнейшая аморфизация структуры материала. С помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что морфология полученного в среде пиридина сульфатированного АГ существенно отличается от морфологии исходного арабиногалактана.

Ключевые слова: арабиногалактан, сульфатирование, сульфатированный арабиногалактан, хлорсульфоновая кислота, пиридин, КР-спектроскопия, рентгеновская дифрактометрия, растровая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

Введение

В настоящее время активно ведется поиск биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения. Это в первую очередь связано с тем, что биологически активные вещества растительного происхождения очень часто обладают различными видами биологической активности и практически не оказывают побочного действия на живой организм. Хорошо известно, что сульфатированные полисахариды имеют ряд новых видов физиологической активности, в частности обнаруживают высокую антикоагулянтную активность и другие виды физиологической активности, такие как противовирусная, антипролиферативная, антисклеротическая, иммуномодулирующая и пр. [1-10]. Одними из таких перспективных и доступных веществ растительного происхождения считают сульфатированные производные АГ [7, 8]. Сульфатированные производные арабиногалактана проявляют высокую антикоагулянтную и гипополипидемическую активность, что делает

перспективным их применение для профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Сульфатированные производные арабиногалактана аналоги гепарина – серосодержащего гликозаминогликана, вещества животного происхождения [11]. Благодаря высокой эффективности гепарин широко используется в клинической практике для предотвращения тромбообразования и предупреждения тромбозов, являющихся важнейшей причиной инфарктов и инсультов, а также феномена внезапной смерти. К сожалению, применение гепарина сопровождается рядом нежелательных побочных эффектов, таких как остеопороз, тромбоцитопения, геморрагии и др. В качестве замены были предложены препараты с подобной активностью, в частности хондроитин сульфат, дерматан сульфат, сульфаты 1,3-L-галактанов морских беспозвоночных, сульфатированные фуканы водорослей и т.д. [1, 9]. Новые антикоагулянты (АК) разрабатывают с целью подавления специфических ферментов или этапов свертывания крови и для получения лекарственных средств с наименьшим числом побочных эффектов.

Известно, что антикоагулянтная активность сульфатированных полисахаридов напрямую зависит от метода сульфатирования, влияющего на степень сульфатирования, характер расположения сульфатных групп, молекулярную массу и др. [9-20]. Так, обнаружено, что антикоагулянтная активность гепарина связана с особенностями строения его молекулы. Для определения строения сложных гепариноподобных соединений используют классические методы: полный и частичный гидролиз, ферментативное расщепление и периодатное окисление (распад по Смитсу), метод метилирования Хеуорзса, а также физико-химические методы: все виды спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), хромато-масс-спектрометрию, электронную и атомно-силовую микроскопию. Последний метод в силу своих особенностей открывает возможность изучения биомакромолекул и живых клеток, используется для определения расположения углеводных цепей в пространстве [18].

Несмотря на обширные исследования по установлению корреляции между структурой и биологической активностью гепариноподобных веществ из различных источников и, в частности, сульфатированного арабиногалактана, соотношение между структурой и биологической активностью гепариноподобных веществ, имеющих сложное строение, в настоящее время изучено недостаточно и полностью не понято.

Для дальнейшего исследования взаимосвязи между строением и биологической активностью сульфатированных производных АГ, полученных разработанным нами способом [21], в данной работе проведено их физико-химическое исследование методами спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), рентгеновской дифрактометрии, растровой электронной (РЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовали арабиногалактан (АГ) древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) производства ООО «Химия древесины» (Иркутск, Россия) под наименованием препарата «ФиброларС»

Получение сульфатов АГ осуществляли по методике [21] сульфатированием механоактивированного АГ хлорсульфоновой кислотой в пиридине с последующим выделением сульфата целлюлозы в виде натриевой соли (содержание серы 13,2 % мас.). Прозрачные плёнки сульфа-

тированных образцов АГ получали испарением 6-7%-ных водных растворов на гладкой стеклянной подложке.

КР-спектры образцов были сняты на NXR FT-Raman модуле для ИК-Фурье спектрометра Nicolet 6700 с охлаждаемым жидким азотом Ge диодом в качестве детектора. В качестве источника света для возбуждения рамановского рассеяния применяли Cw-Nd: YAG-лазер с возбуждающей линией 1,064 нм. КР-спектры были записаны в диапазоне 200-3500 см^{-1} с использованием рабочего спектрального разрешения 8 см^{-1} . Выходная мощность лазера составляла 100 mW. Каждый образец был дважды проанализирован при одинаковых условиях, и было накоплено 400 разверток. Усреднённый спектр был сформирован как окончательный спектр соответствующего образца, и выполнена векторная нормировка спектра.

Интегрирование пиков осуществили с помощью операционного спектроскопического программного обеспечения OPUS Ver. 6.0 (Bruker Optik GmbH, Эттлинген Германия). Анализ данных был выполнен с помощью OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation, Массачусетс США).

Рентгенофазовый анализ проведен на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3 с использованием $\text{Cu K}\alpha$ монохроматизированного излучения ($\lambda = 0,154$ нм), напряжение U 30 кВ, сила тока 25 мА. Шаг сканирования 0,02 град., время накопления в точке 1 с. Съемку проводили в интервале брэгговских углов 2Θ от 5,00 до 70,00 град.

Электронные микрофотографии получены на растровом электронном микроскопе TM-1000 HITACHI (Япония) с ускоряющим напряжением 15 kV и с увеличением от 100 до 10 000 крат с разрешением 30 нм.

Исследования пленок сульфатированного АГ методом АСМ в полуконтактной моде проводили с использованием мультимодового сканирующего зондового микроскопа Solver P47 (НТ-МДТ, Москва), оснащённого 14 мкм сканером (сканирование образцом) и юстировочным столиком (модель SKM). Сканирование образцов осуществлялось на воздухе при комнатной температуре. В работе использовали кремниевые прямоугольные кантилеверы NSG11 (НТ-МДТ, Москва) с типичной резонансной частотой колебаний около 170 кГц и константой жёсткости ≈ 20 Н/м; длина балки составляла 10-15 мкм, радиус кривизны иглы был менее 10 нм. Сканирование производилось не менее чем в 3-4 точках на нескольких площадках. Скорость сканирования составляла 1,5-2 Гц, разрешение получаемого изображения 256×256 точек. Как правило, сглаживание или иную обработку изображений, за исключением вычета поверхности второго порядка, не проводили.

Результаты и обсуждение

В продолжение работы по изучению сульфатирования арабиногалактана (АГ), выделенного из древесины лиственницы хлорсульфоновой кислотой в пиридине, изучены строение и свойства натриевых солей полученных сульфатов АГ.

Структура АГ древесины лиственницы и сульфатированных производных исследована методом КР-спектроскопии (рис. 1).

Введение сульфатной группы в структуру АГ подтверждается появлением в КР-спектрах натриевых солей сульфатированных образцов АГ новых полос поглощения в областях 418-422, 588-592, 823-843, 1074-1078, 1263-1267 см^{-1} .

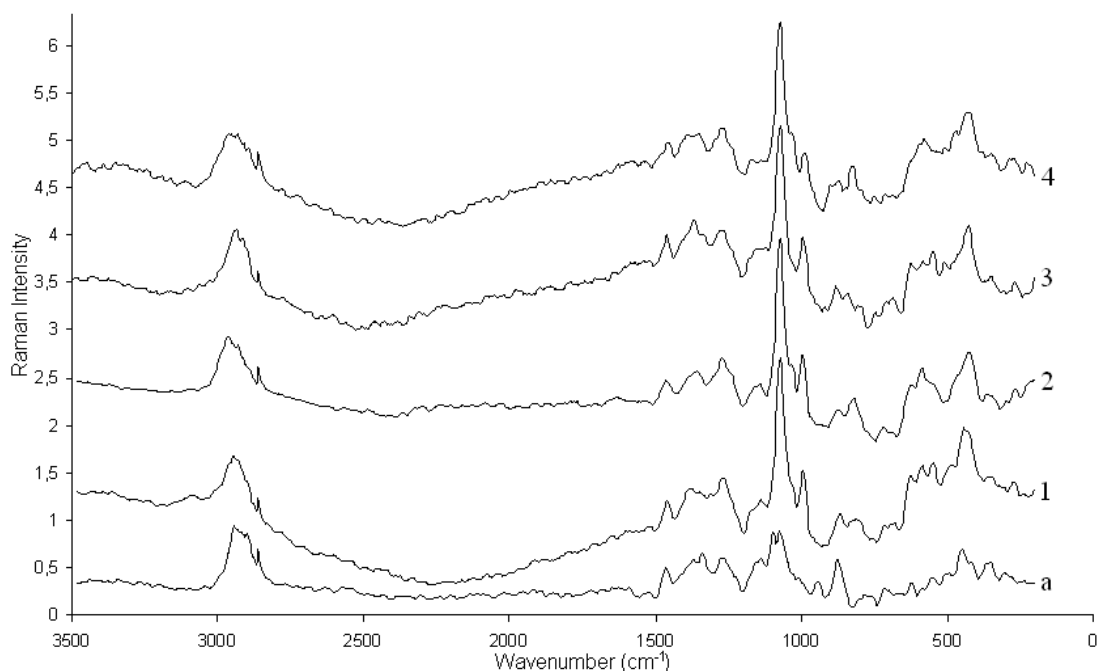


Рис. 1. КР-спектры образцов: а – исходного АГ; 1–4 – сульфатированных образцов АГ

Полоса поглощения в области $418\text{--}422\text{ см}^{-1}$ соответствует деформационным колебаниям SO_3 групп $\delta(\text{SO}_3)$, а полоса при $588\text{--}592\text{ см}^{-1}$ может быть отнесена к деформационным колебаниям $\delta(\text{O}=\text{S}=\text{O})$. Полоса поглощения в области $823\text{--}843\text{ см}^{-1}$ присуща $\text{C}=\text{O}-\text{S}$ -валентным колебаниям $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{S})$. Полоса поглощения в диапазоне $1074\text{--}1078\text{ см}^{-1}$ доминирует в спектре и присуща симметричным валентным колебаниям $\nu_s(\text{O}=\text{S}=\text{O})$. Другой пик при $1263\text{--}1267\text{ см}^{-1}$ является сигналом асимметричных валентных колебаний $\nu_{as}(\text{O}=\text{S}=\text{O})$.

Интенсивная полоса в области 1097 см^{-1} , относящаяся к симметричным валентным колебаниям гликозидных связей $\nu_s(\text{COC})$, наблюдается в исходном АГ, однако в сульфатированных образцах из-за введения сульфатных групп её интенсивность снижается и сигнал исчезает.

Рентгенодифракционные снимки АГ показали аморфное строение полисахарида, на которых четко дифференцируется аморфное гало АГ (рис. 2). Аморфное строение АГ также отмечено в работах [22, 23].

Введение сульфатных групп в макромолекулярную структуру АГ приводит к изменению вида рентгенограммы. Так, на рентгенограмме сульфатированного образца АГ наблюдалось сглаживание пика в интервале углов от 15 до $25^\circ \Theta$, что говорит о том, что происходит дальнейшая аморфизация структуры материала.

Методом растровой электронной микроскопии проведено исследование образцов АГ до и после сульфатирования. Как показано на рис. 3а, АГ состоит из агрегированных и одиночных гранул различной формы и размера. Преимущественно гранулы имеют глобулярную форму с диаметром от 10 до 90 мкм . Некоторые частицы собраны в агломераты, размер которых достигает 300 мкм .

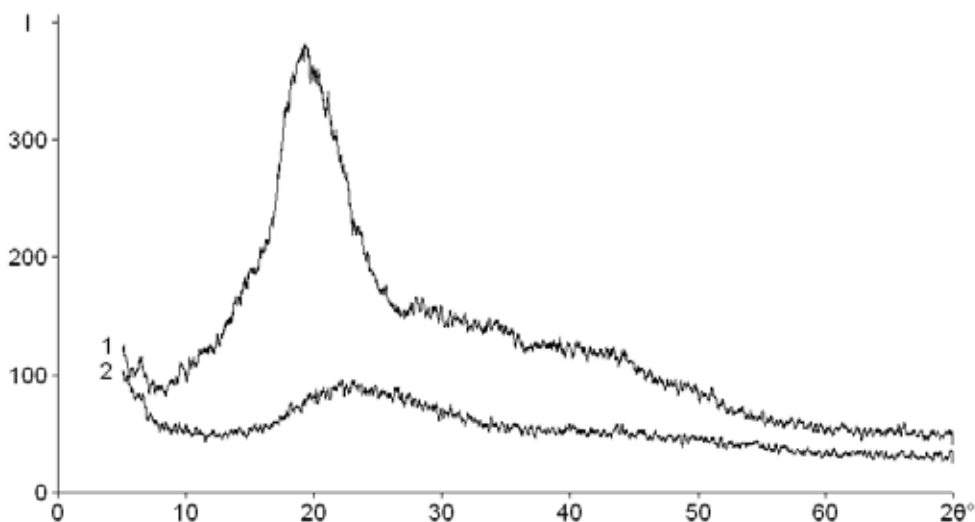


Рис. 2. Рентгенограммы образцов исходного (1) и сульфатированного (2) АГ

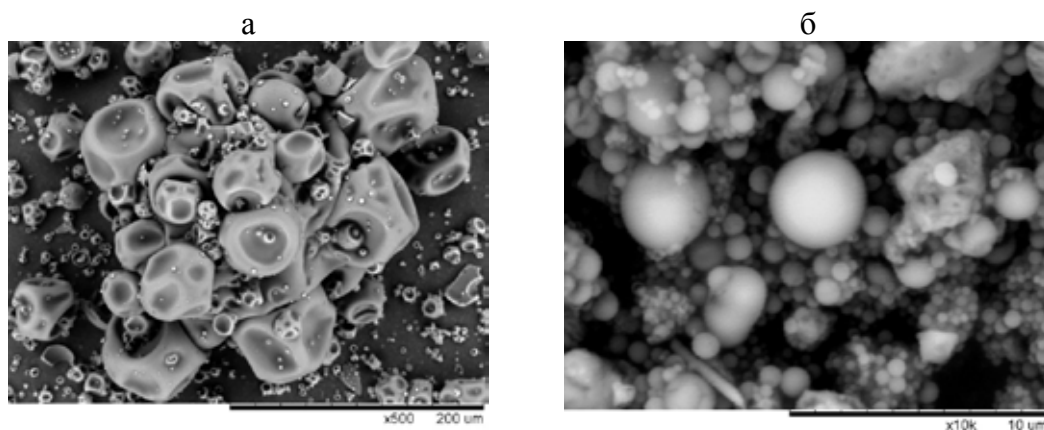


Рис. 3. РЭМ-изображения образцов исходного АГ (а) и сульфатированного АГ (б)

После сульфатирования образцы имеют морфологию, несколько отличную от исходного АГ. Как видно на рис. 3б, сульфатированный АГ состоит из сферических частиц, образующих агломераты со средними размерами около 2-10 мкм. Размеры отдельных частиц варьируют в интервале от 5 мкм и менее.

К сожалению, методом РЭМ достаточно сложно определить точную высоту наблюдаемых объектов, особенно наноразмерных, поэтому синтезированные плёнки сульфатированного АГ древесины лиственницы были изучены методом АСМ в полуконтактной моде на воздухе, которая позволяет определить не только латеральные размеры объектов, но и их высоту с точностью до 0,1 нм [24]. Полученные данные приведены на рис. 4а и 4б.

Как видно на рис. 4а и 4г, поверхность сульфатированного АГ состоит из однородных кристаллитов, имеющих сферическую форму с диаметром примерно 100-200 нм. Кристаллиты

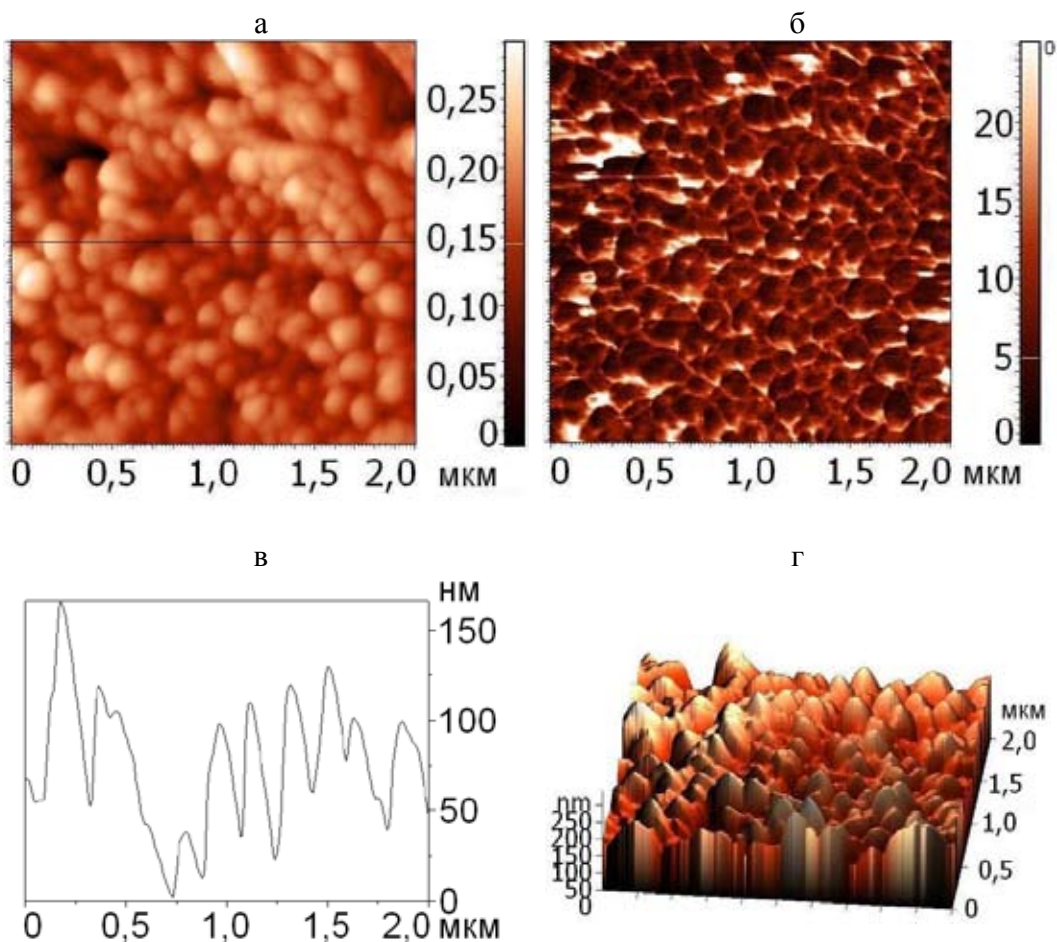


Рис. 4. АСМ-изображение пленки сульфатированного образца АГ (а – рельеф, б – фазовый контраст, в – профиль поперечного сечения вдоль линии на изображении а, г – рельеф в 3D)

расположены равномерно по поверхности образца и не образуют агрегатов. Расчет среднеквадратичной шероховатости по профилю поперечного сечения (рис. 4в) дает величину примерно 80 нм.

Судя по изображению фазового контраста (рис. 4б), поверхность плёнки сульфатированного АГ достаточно однородна по своему фазовому составу и не содержит посторонних примесей. Таким образом, можно судить о чистоте целевого продукта, свободного от посторонних примесей, присутствующих в реакционном растворе.

Выводы

1. Расшифрованы КР-спектры поглощения натриевых солей сульфатированного арабиногалактана, полученного из древесины лиственницы путем сульфатирования его хлорсульфоновой кислотой в среде пиридина. Введение сульфатных групп в структуру полисахарида подтверждено появлением в КР-спектрах новых полос поглощения в областях 418-422, 588-592, 823-843, 1074-1078, 1263-1267 см^{-1} .

2. Методом рентгеновской дифрактометрии показано, что исходные образцы АГ из древесины лиственницы имеют аморфное строение, а в процессе сульфатирования происходит дальнейшая аморфизация структуры материала.

3. С помощью растровой электронной микроскопии (РЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что сульфаты АГ, полученные в системе «хлорсульфоновая кислота – пиридин», имеют морфологию, отличную от исходного АГ. Поверхность сульфатированного АГ состоит из однородных кристаллитов, имеющих сферическую форму.

Благодарности

В работе задействованы приборы Красноярского регионального центра коллективного пользования СО РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ – проект № 12-03-93117.

Список литературы

1. Местечкина Н.М., Щербухин В.Д. Сульфаты полисахаридов и их антикоагулянтная активность // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 3. С. 291-298.
2. Ma X., Guo Z., Wang D., Hu Y., Shen Z. Effect of sulfated polysaccharides and their prescriptions on immune response of ND vaccine in chicken // Carbohydr. Polym. 2010. V. 82, № 1. P. 9-13.
3. Huang X., Hu Y., Zhao X., Lu Y., Wang J., Zhang F., Sun J. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of astragalus polysaccharide for ND vaccine // Carbohydr. Polym. 2008. V. 73, № 2. P. 303-308.
4. Huang X., Wang D., Hu Y., Lu Y., Guo Z., Kong X., Sun J.. Effect of sulfated astragalus polysaccharide on cellular infectivity of infections bursal disease virus // Intern. J. Biol. Macromol. 2008. V. 42, № 2. P. 166-171.
5. Guo Z., Hu Y., Wang D., Ma X., Zhao X., Zhao B., Wang J., Liu P. Sulfated modification can enhance the adjuvant activity of lentinan and improve the immune effect of ND vaccine // Vaccine. 2009. V. 27, № 5. P. 660-665.
6. Дрозд Н.Н., Кузнецова С.А., Мифтахова Н.Т., Макаров В.А., Васильева Н.Ю., Левданский А.В., Бутылкина А.И. Антикоагулянтная активность экстрактов коры кедр, циннабона коры ели, березы и целлюлозы, выделенной из древесины осины, пихты и соломы пшеницы // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 73. № 6. С. 5-9.
7. Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования (обзор) // Химия растительного сырья. 2003. № 1. С. 27-37.
8. Патент № 2319707 РФ. Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана, обладающих антикоагулянтной и гиполипидемической активностью / Я.А. Костыро, Т.В. Ганенко, С.А. Медведева, Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов // Заявл. 09.01.2007; Опубл. 20.03.2008.
9. Дрозд Н. Н., Банникова Г. Е., Макаров В. А., Варламов В. П. Антикоагулянтная активность сульфатированных полисахаридов // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2006 Т. 69 № 6. С. 51-60.
10. Alban S., Schauerte A., Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates // Carbohydr. Polym. 2002. V. 47, № 3. P. 267-276.

11. Desai U.R. New antithrombin-based anticoagulants // *Med. Res. Rev.* 2004. V. 24, № 2. P. 151-181.
12. Pereira M.S., Melo F.R., Mourão P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? // *Glycobiology.* 2002. V. 12, № 10. P. 573-580.
13. Chaidedgumjorn A., Toyoda H., Woo E.R., Lee K.B., Kim Y.S., Toida T., Imanari T. Effect of (1→3)- and (1→4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity // *Carbohydrate Res.* 2002. V. 337, № 10. P. 925-933.
14. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // *Биоорганическая химия.* 2009. Т. 35. № 3. С. 293-310.
15. Усов А.И. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полисахаридов красных водорослей // *Химия растительного сырья.* 2001. № 2. С. 7-20.
16. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from Marine Algae // *Mar. Drugs.* 2011. V. 9. № 2. P. 196-223.
17. Zhang K., Brendler E., Fischer S. FT Raman investigation of sodium cellulose sulfate // *Cellulose.* 2010. V. 17. № 2. P. 427-435.
18. Round A.N., MacDougall A.J., Ring S.G., Morris V.J. Unexpected branching in pectin observed by atomic force microscopy // *Carbohydr. Res.* 1997. V. 303, № 3. P. 251-253.
19. Huang H., Zhang W.-D. Preparation of cellulose sulphate and evaluation of its properties // *J. Fiber Bioeng. Informat.* 2010. V. 3. № 1. P. 32-39.
20. Zhang H., Wang Z.-Y., Yang L., Yang X., Wang X., Zhang Z. *In Vitro* Antioxidant activities of sulfated derivatives of polysaccharides extracted from *Auricularia auricular* // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. № 5. P. 3288-3302.
21. Патент № 2466143 РФ. Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Васильева Н.Ю., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Кузнецова С.А. // Оpubл. 10.11.2012.
22. Никитин Н.И., Соловьев И.А. К изучению арабогалактана сибирской лиственницы // *Журнал прикладной химии.* 1935. Т. 8. № 6. С. 1016-1022.
23. Сухов Б.Г., Александрова Г.П., Грищенко Л.А. и др. Нанобиокомпозиты благородных металлов на основе арабиногалактана: получение и строение // *Журнал структурной химии.* 2007. Т. 48. № 5. С. 979-984.
24. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород: РАН, Институт физики микроструктур, 2004. 114 с.